

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HENRIQUE YAZLLE RIBEIRO PERES

HUMOR VÍTREO: VANTAGENS E DESVANTAGENS
PARA A TOXICOLOGIA FORENSE

CURITIBA

2017

HENRIQUE YAZLLE RIBEIRO PERES

HUMOR VÍTREO: VANTAGENS E DESVANTAGENS
PARA A TOXICOLOGIA FORENSE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à banca avaliadora como
requisito parcial para a conclusão do Curso
de Biomedicina, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof Dr Paulo Roberto Dalsenter

CURITIBA
2017

RESUMO

A toxicologia forense é um ramo da toxicologia que se dedica a esclarecer o papel de drogas e venenos nas causas de mortes e crimes. Para isso são utilizadas matrizes biológicas, como sangue e urina, para a identificação de substâncias em cadáveres com o auxílio das análises toxicológicas, através de metodologias baseadas em técnicas altamente sofisticadas. Devido a certos fatores negativos do uso de matrizes mais comuns, como mudanças e alterações que sofrem pós-morte, o uso de matrizes alternativas tem sido estudado. Uma dessas que ainda é pouco utilizada, humor vítreo, parece apresentar certas vantagens em relação as tradicionais, como maior estabilidade, facilidade de coleta e menor chance de sofrer contaminação devido às alterações pós-morte que ocorrem no corpo humano. Para melhor entender os benefícios dessa matriz alternativa, uma análise da literatura é essencial. Vários autores já demonstraram resultados positivos com a utilização de humor vítreo para a identificação de uma série de xenobióticos de relevância forense, mas mesmo assim essa matriz continua sendo pouco usada em perícias. Portanto, a finalidade desse trabalho, foi buscar na literatura informações relevantes sobre o uso do humor vítreo, tanto em pesquisas como em casos clínicos, para avaliar se exames utilizando essa matriz serviriam como substituto, ou complemento, dos exames tradicionais com sangue e urina. Dessa forma, os institutos médico-legais podem estudar a possibilidade do desenvolvimento de uma metodologia voltada ao uso do humor vítreo nos exames de rotina de seus laboratórios, possivelmente facilitando os procedimentos analíticos.

Palavras-chave: Humor vítreo. Corpo Vítreo. Toxicologia forense. Matrizes alternativas. Toxicologia analítica.

ABSTRACT

Forensic toxicology is a branch of toxicology that is dedicated to clarifying the role of drugs and poisons in the causes of deaths and crimes. To this end, biological matrices such as blood and urine are used to identify drugs in cadavers with the aid of toxicological analyzes, methodologies based on highly sophisticated techniques of analytical chemistry. Due to certain negative factors of the use of more common matrices, such as changes and alterations that they suffer postmortem, the use of alternative matrices has been studied. One of them that is still under-utilized, vitreous humor, seems to present certain advantages over traditional ones, such as greater stability, ease of collection and less chance of being contaminated due to postmortem changes occurring in the human body. To better understand the benefits of this alternative matrix, a literature review is essential. Several authors have already demonstrated positive results with the use of vitreous humor for the identification of a series of xenobiotics of forensic relevance, but still this matrix is under used in forensics. Therefore, the purpose of this work was to search the literature for relevant information on the use of vitreous humor, both in research and in clinical cases, to evaluate whether exams using this matrix would serve as a substitute or supplement for traditional blood and urine tests. Thus, medical-legal institutes can study the possibility of developing a methodology aimed at the use of vitreous humor in the routine exams of their laboratories, possibly facilitating the analytical procedures.

Keywords: Vitreous humor. Vitreous body. Forensic toxicology. Alternative Matrices. Analytical toxicology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Toxicologia forense.....	6
1.2 Identificação e quantificação de drogas em matrizes biológicas.....	6
1.3 Matrizes biológicas.....	7
1.4 Matrizes Alternativas: Humor Vítreo.....	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4 RESULTADOS.....	11
4.1 Toxicocinética do HV.....	11
4.2 Coleta, armazenamento e preparo das amostras de HV.....	18
4.3 Metodologias analíticas utilizando HV.....	21
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Toxicologia forense

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos de drogas e produtos químicos em sistemas biológicos (The Forensic Toxicology Council, 2010). A Toxicologia Forense é a área da toxicologia que se aplica a propósitos legais e tem como objetivo principal fornecer respostas e esclarecer as questões que surgem durante investigações criminais. Ela utiliza como ferramenta as análises toxicológicas, que são técnicas laboratoriais utilizadas para detectar a presença de substâncias exógenas, determinar suas concentrações, e, por fim, relacioná-las aos seus efeitos tóxicos no organismo, com o objetivo de estabelecer se houve ou não a intoxicação que recai sob suspeita (BORDIN *et al.*, 2015).

Os peritos toxicologistas trabalham juntos com outros profissionais, como patologistas e médico-legistas, para ajudar a estabelecer o papel de drogas e venenos na causa de mortes. O toxicologista identifica e quantifica a presença de drogas, e outros produtos químicos, em amostras de sangue, urina, tecido e outras matrizes biológicas. Isso é feito utilizando instrumentação da química analítica e outros equipamentos da área biomédica que são capazes de detectar pequenas quantidades de materiais tóxicos, identificando-os positivamente e medindo com precisão suas concentrações (The Forensic Toxicology Council, 2010). Precisão, validade e confiabilidade são essenciais, pois as informações coletadas por essas análises são usadas na determinação da causa e do modo de mortes. Por esse motivo, o toxicologista é um membro-chave da equipe de especialistas que ajuda nessa determinação, utilizando conhecimentos da farmacologia como a cinética de drogas e interações, metabolismo, reações adversas e idiossincráticas, tolerância a drogas, artefatos pós-morte, estabilidade de drogas e muitos outros.

1.2 Identificação e quantificação de drogas em matrizes biológicas

As amostras biológicas que podem ser utilizadas para realização dos exames da toxicologia forense são várias, dentre elas: sangue, urina, cabelo, saliva, suor, mecônio e humor vítreo, esse último sendo o foco desse trabalho. A escolha da matriz

a ser usada depende de fatores relacionados com a natureza da ocorrência, da integridade da amostra submetida à análise, do tipo de investigação (ante-morte ou pós-morte), com a facilidade de coleta, e, as considerações analíticas e de ensaio juntamente com a interpretação dos resultados (GALLARDO *et al.*, 2008). Dependendo do caso, às vezes é necessário optar por uma matriz biológica específica que apresenta maior resistência às mudanças que o corpo humano sofre pós-morte, como os processos de redistribuição, autólise e a putrefação.

Os avanços nas técnicas de concentração de amostras, e nas técnicas da química analítica moderna, foram cruciais para o desenvolvimento das metodologias utilizadas pela toxicologia forense hoje, pois possibilitaram a detecção de baixíssimas quantidades de drogas em amostras extremamente complexas. As técnicas mais utilizadas são a cromatografia em fase gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), isso para a separação dos analitos. Já para a identificação das substâncias geralmente utilizam-se equipamentos de espectrometria de massas, além do detector por arranjo de diodos, entre outras variações. Estas técnicas são comumente escolhidas por apresentarem maior sensibilidade, compatibilidade com as concentrações dos compostos de interesse encontradas nas diversas amostras biológicas, e por permitirem a confirmação da presença dos analitos com maior precisão. Mas como afirma BORDIN *et al.*, toda técnica analítica, por mais seletiva e sensível que seja, apresenta limitações, as quais podem ser reduzidas com um preparo de amostra eficiente. Esse preparo caracteriza-se pelo processo chamado extração, que visa isolar o analito de interesse a partir da matriz, minimizando e eliminando os interferentes (endógenos e exógenos), além de propiciar a concentração da substância, sendo um processo geralmente indispensável para o emprego de técnicas de detecção e quantificação de substâncias de interesse forense.

1.3 Matrizes biológicas

Como já foi citado, existe uma variedade grande de amostras biológicas que podem ser utilizadas para as análises da toxicologia forense, mas as duas mais comumente utilizadas são o sangue e a urina.

O sangue é um fluido complexo, constituído em sua maioria por água (80%), proteínas solúveis, gorduras, sais e células suspensas. O sangue é a matriz mais amplamente estudada na toxicologia forense, pois ela fornece a correlação da concentração da droga no sangue com o estado clínico do indivíduo. Além disso, o uso da razão droga original/metabólito pode ser bastante útil para predizer o período decorrido desde a administração (PAWLISZYN *et al.*, 2002). Com relação à coleta do sangue pós-morte, precisa-se considerar os fenômenos de redistribuição, os quais participam a distribuição de drogas de órgãos que atuam como reservatórios, o movimento do sangue e outros processos provenientes das alterações cadavéricas. Segundo Levine (1993), amostras de sangue sempre devem ser obtidas. Idealmente, o sangue deve ser coletado de dois locais diferentes, um do coração e o outro de um local periférico, como a veia femoral ou jugular por exemplo. Em casos como acidentes com veículos automotores, em que ocorreu grande traumatismo torácico, o sangue cardíaco pode ser contaminado e a amostra alternativa de sangue pode ser usada para interpretação dos resultados. O sangue também é a matriz de escolha se houver suspeita de comprometimento causado por drogas. Apesar disso, o sangue possui uma janela de detecção restrita com relação às drogas de abuso, já que estas podem ser rapidamente metabolizadas por proteínas presentes no sangue. Em casos pós-morte de avançada putrefação do cadáver, o sangue pode sofrer a atividade de microrganismos, em especial as espécies *Escherichia coli* e *Candida albicans*, que são responsáveis pela formação endógena do etanol, inviabilizando a sua utilização em análises como as de dosagem alcoólica, um exame extremamente comum em laboratórios forenses. Por isso, o sangue coletado para análises toxicológicas deve ser preservado com fluoreto de sódio para limitar a formação de microrganismos e aumentar a estabilidade de certas substâncias (LEVINE, 1993).

Quanto a urina, ela consiste de um ultrafiltrado do sangue formado continuamente pelos rins a partir do qual foram reabsorvidas substâncias essenciais ao metabolismo do organismo (glicose, aminoácidos, água). Em sua composição constam substâncias químicas orgânicas (ureia, ácido úrico e creatinina) e inorgânicas (como íons cloreto e sódio). É uma matriz biológica de escolha tradicional nas análises toxicológicas forenses e seu uso é bem estabelecido (SKOPP, 2004). A urina possui algumas vantagens sobre o sangue. Muitas drogas e seus metabolitos estão presentes em concentrações mais altas na urina do que no sangue. Algumas classes de drogas também permanecem na urina por mais tempo do que no sangue, as vezes

alguns dias seguindo seu uso. A urina pode ser coletada de forma não invasiva e não é necessário pessoal qualificado para realizar a coleta nesses casos. Nos casos pós-morte, a urina, se viável, pode ser coletada diretamente da bexiga (LEVINE, 1993). Entretanto, dependendo da droga, apenas o uso recente pode ser detectado pela urina, cerca de 2 a 5 dias após o consumo em média. Além disso, assim como ocorre com o sangue, em casos pós-morte, amostras de urinas estão mais suscetíveis a sofrerem alterações, como a contaminação por microrganismos em casos de putrefação avançada, o que limita sua utilização em determinados casos.

1.4 Matrizes Alternativas: Humor Vítreo

Apesar do sangue e a urina serem as matrizes convencionais mais prevalentes e utilizadas para realização das análises toxicológicas, nas últimas décadas, as matrizes biológicas alternativas ou não convencionais têm apresentado relevante importância na toxicologia. Isso ocorre principalmente devido às suas vantagens quando comparadas com as amostras convencionais, considerando que possuem características interessantes em relação à estabilidade dos analitos, método de coleta facilitado e maior janela de detecção.

Uma dessas matrizes alternativas, que será o foco desse trabalho daqui para frente, é o chamado Humor Vítreo (HV). O HV, também conhecido como corpo vítreo, é uma substância gelatinosa contida na câmara posterior do olho, entre a lente cristalina e a retina. Ele desempenha um papel mecânico, mantendo a retina no lugar e mantendo a forma esférica e o tônus do globo ocular (BÉVALOT, *et al.*, 2016). É constituído basicamente por água (99%), além de sais e uma pequena porcentagem de proteína (0,2%), especialmente colágeno. Neste fluido são ausentes as esterases, responsáveis pela rápida degradação de substâncias de interesse forense no sangue, como a cocaína, heroína e 6-acetilmorfina. As drogas e toxinas chegariam ao HV através da passagem pela barreira sangue-retina, por meio de transporte ativo e difusão passiva. Ao contrário do sangue e da urina, geralmente nesta matriz a presença da droga original é predominante em relação aos metabólitos (BORDIN *et al.*, 2015). O HV é ideal para análises químicas pós-morte, pois está relativamente isolado do sangue e outros fluidos corporais que são afetados por alterações cadavéricas, como a redistribuição e a hemoconcentração. Ela também resiste a

putrefação por mais tempo do que outros fluidos corporais (7 dias em média), embora não seja totalmente imune a ele, permitindo sua utilização em casos de estado de putrefação avançada ou carbonização parcial do corpo (COLLINS, 2016).

Devido a existência dessas e outras vantagens que o HV possui em relação às matrizes de escolha tradicionais, torna-se interessante uma avaliação profunda das pesquisas relacionados ao uso do HV nas análises da toxicologia forense. Isso para que os institutos médico-legais, como os do Brasil por exemplo, possam talvez considerar a adoção de amostras de HV nos exames de rotina dos laboratórios forenses. Dito isso, o objetivo desse trabalho é justamente fornecer uma revisão aprofundada sobre a utilização de HV como uma matriz biológica alternativa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico sobre a utilização de HV como uma matriz biológica alternativa nas análises de toxicologia forense. A finalidade desse levantamento foi de destacar as vantagens e desvantagens do uso dessa matriz para que os institutos médico-legais brasileiros possam considerar a viabilidade da implantação de uma metodologia analítica voltada ao uso de HV na rotina de seus laboratórios forenses.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar se o processo de obtenção das amostras de HV é facilitado em relação às de sangue e urina e também se o procedimento e materiais necessários para obtenção dessas amostras são de fácil acesso.
- ✓ Analisar se as técnicas de preparo das amostras de HV são menos trabalhosas do que as utilizadas para as matrizes biológicas mais comuns.
- ✓ Verificar se existe uma boa correlação entre as concentrações de substâncias encontradas no HV, sangue e urina, com o objetivo de estudar a possibilidade de extrapolar as concentrações encontradas no HV para o sangue ou urina.

- ✓ Constatar se as mesmas substâncias que são encontrados rotineiramente no sangue e na urina também podem ser identificados no HV.
- ✓ Comparar os parâmetros de linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade, precisão e recuperação entre HV, sangue e urina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho consiste em uma pesquisa bibliográfica, a qual levantei dados de artigos científicos e relatos de casos clínicos da utilização do HV como matriz biológica na quantificação e/ou qualificação de drogas de interesse forense em cadáveres. Para isso, foi feito um levantamento bibliográfico em bancos de dados como PubMed, ScienceDirect, SciELO e MEDLINE utilizando as seguintes palavras-chave: forensic toxicology, vitreous humor, vitreous body, alternative matrices, entre outros.

4 RESULTADOS

4.1 Toxicocinética do HV

Infelizmente, ainda existem poucos estudos relacionados a toxicocinética de drogas de interesse forense no HV, por isso a maioria do que se sabe sobre a passagem de xenobióticos para o HV vem de estudos relacionados a fármacos oftálmicos. Também deve ser levado em consideração a existência da barreira sangue-retina (BSR), uma barreira seletiva assim como a barreira hemato-encefálica.

Na verdade, ela é composta por duas barreiras. Primeiro, o epitélio pigmentar da retina que separa a retina da coroide, também chamado de BSR externa. As células do epitélio pigmentar possuem a particularidade de serem ligadas entre si por junções intercelulares (zônulas de adesão e oclusão), forçando o trânsito intracelular de compostos. E o segundo, que constitui o epitélio não fenestrado dos vasos sanguíneos da retina, é a BSR interna. As duas barreiras não são sucessivas, eles estão associados com as duas vias de penetração da retina: capilares coroides para a BSR externa e capilares retinianos para a BSR interna (BÉVALOT *et al.*, 2016). A

importância da BSR deriva do fato de que os xenobióticos de interesse forense penetram no HV através da circulação sistêmica. De acordo com Guadana *et al.* (2010), existem duas rotas de eliminação do HV: uma via posterior através da BSR na direção oposta e uma via anterior por difusão para o humor aquoso através dos espaços zonulares, com eliminação pela renovação do humor aquoso e fluxo sanguíneo uveal. Um exemplo dessas rotas pode ser visto na **Figura 1**.

A penetração de fármacos para o HV pela BSR depende de uma série de fatores, entre eles a concentração plasmática, as propriedades físico-químicas e farmacológicas da substância, o volume de distribuição, a ligação as proteínas plasmáticas, etc. As drogas podem ser transportadas passivamente ou ativamente através da BSR: em geral, quanto maior o peso molecular e/ou hidrofília, mais provável é a ocorrência de transporte ativo. Dado que apenas as drogas livres (não ligadas a proteínas) podem atravessar as barreiras biológicas, a porcentagem de ligação a proteínas plasmáticas é outro fator que determina a difusão. Existem muitas proteínas transmembrana expressas na BSR que podem atuar como transportadoras, desempenhando um papel na biodisponibilidade de drogas no HV. Podem distinguir-se dois tipos principais: bombas de efluxo, pertencentes à superfamília de transportadores ABC e bombas de influxo, pertencentes à superfamília de transportadores de soluto. Os principais transportadores de efluxo identificados no olho são os transportadores MDR (*multidrug resistant*), incluindo a P-glicoproteína (P-gp ou MDR1), a MRP (*multidrug resistance protein*) e a BCRP (*breast cancer resistance protein*). Ao contrário da difusão passiva, o transporte ativo pode ser limitado pela saturação, se a concentração da substância exceder a capacidade de transporte ou pela concorrência com outros compostos ou a inibição por certos substratos específicos. Na toxicologia forense, tais interações podem ter um impacto significativo na interpretação da concentração de xenobióticos no HV, especialmente porque afeta a razão entre as concentrações do HV/sangue (BÉVALOT *et al.*, 2016).

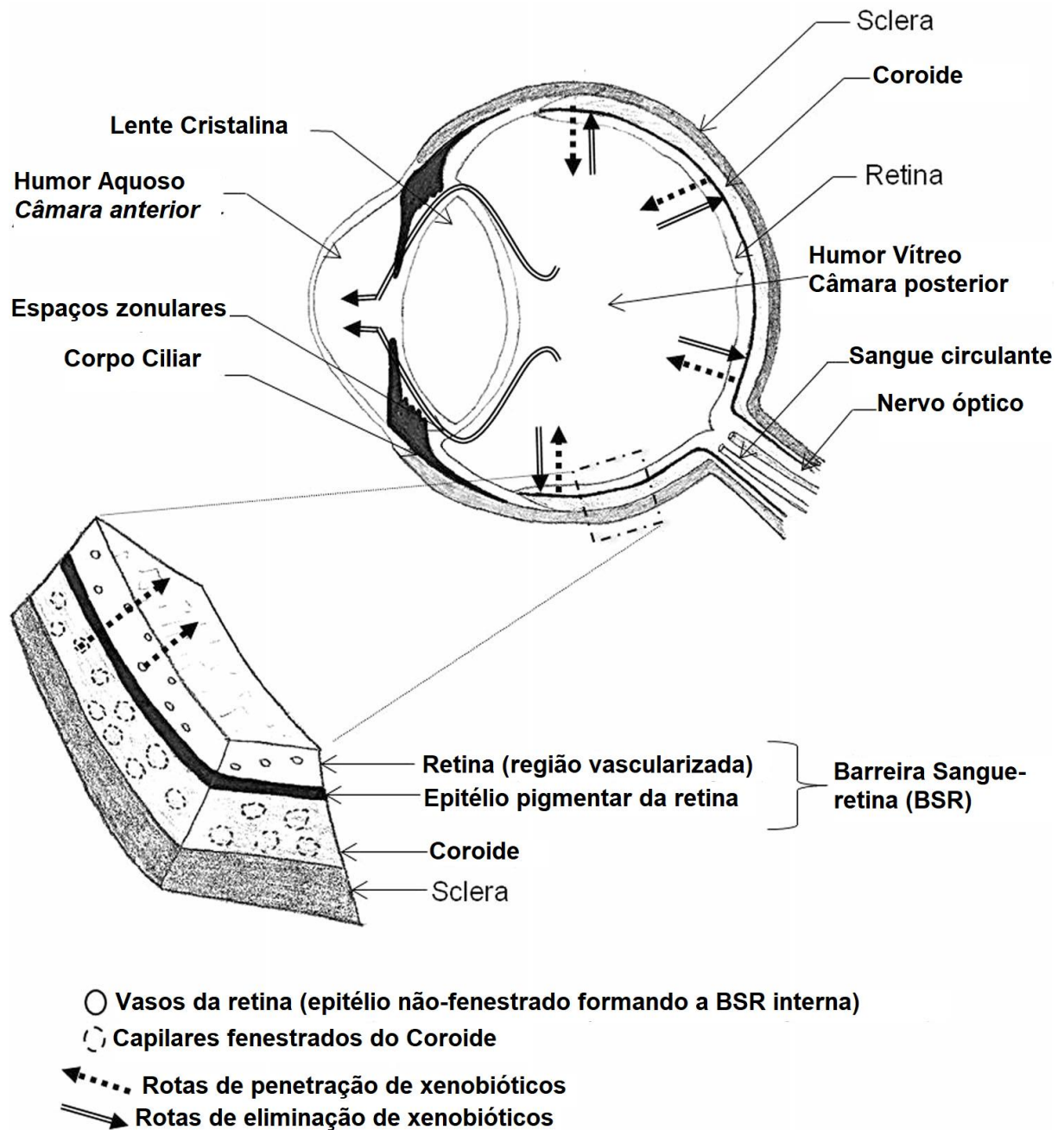


Figura 1 - Anatomia do olho e da barreira sangue-retina (adaptada de URTTI, 2006)

Dentre os trabalhos que existem sobre a farmacocinética de drogas de interesse forense no HV, alguns merecem destaque por apresentarem algumas das características favoráveis à sua utilização nas análises toxicológicas. Primeiramente destaca-se o trabalho de Gottas *et al.* (2016), em que eles analisaram a farmacocinética de heroína e seus metabólitos em um modelo animal vivo (porcos). Mantendo os animais sobre anestesia e administrando uma injeção em bolus de 20

mg de heroína através de um cateter venoso central na veia jugular interna direita, amostras de HV foram coletadas utilizando uma sonda de microdiálise, implantada no olho dos animais (**Figura 2**), em intervalos de 10 minutos por um período de 300 minutos. Amostras de sangue também foram coletadas ao longo do experimento para comparação. A metodologia analítica utilizada para medir as concentrações de heroína e seus metabolitos nas amostras foi a mesma utilizada em um trabalho anterior dos mesmos autores (GOTTAS *et al.*, 2012). Os pesquisadores afirmam que: apesar de não ter sido possível a detecção de heroína no HV; das concentrações encontradas no HV de 6-monoacetilmorfina (6-MAM), morfina e morfina-3-glucuronídeo serem inferiores às encontradas no sangue; e da distribuição da droga do sangue para o HV ser lenta, diminuindo as chances dos metabolitos serem detectados num caso com intervalo pós-administração da droga curto, o intervalo de tempo em que os metabolitos da heroína podem ser detectados e quantificados no HV foi muito maior do que no sangue. Nesse estudo, também foram coletadas algumas amostras de sangue e HV após a eutanásia dos animais. Essas amostras demonstraram que as concentrações dos metabolitos da heroína, principalmente 6-MAM, continuam a subir mesmo quando as concentrações deles no sangue já estão abaixo do limite de detecção. Visto isso, se o período de tempo aproximado entre a ingestão e a morte é conhecido, a concentração sanguínea verdadeira ante-morte pode ser calculada com base na concentração no HV. Muitas vezes, uma concentração sanguínea muito alta de morfina é vista em conjunto com uma baixa concentração em HV, o que pode representar a verdadeira situação ante-morte se a morte ocorreu na primeira hora após a ingestão de heroína; no entanto, se houvesse decorrido algumas horas, o que é muitas vezes o caso nas mortes por heroína, a verdadeira concentração de morfina no sangue ante-morte seria mais próxima ou menor do que a concentração de morfina observada no HV (GOTTAS *et al.*, 2016).

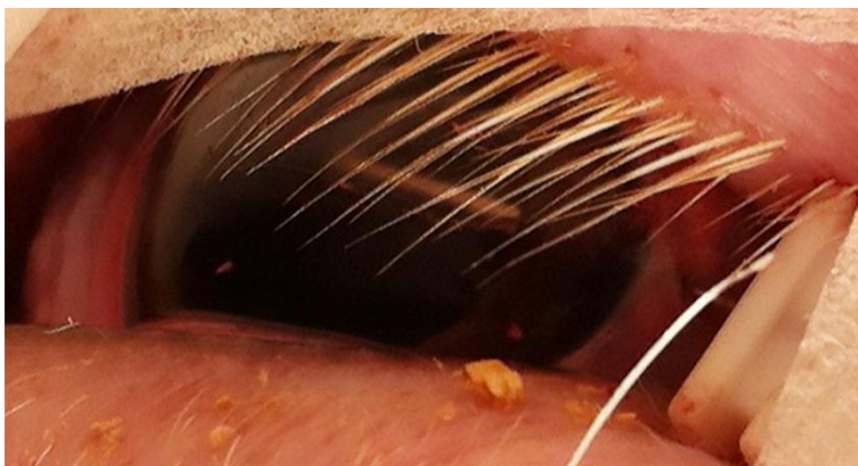


Figura 2 - Guia de microdiálise penetrando a pars plana com a sonda que se estende através do eixo guia na câmara vítrea do olho (GOTTAS *et al.*, 2016)

Outro estudo relevante é o de Fernández *et al.* (1989), em que eles compararam a farmacocinética do álcool no HV e no sangue utilizando um modelo animal (coelho). Os animais foram anestesiados e traqueostomizados para serem acoplados a um respirador artificial. Em seguida, etanol dissolvido em soro fisiológico foi então injetado na veia marginal da orelha em uma dose de 0,4 mg/kg durante 1 minuto aproximadamente. As amostras de sangue foram extraídas através de um cateter inserido na veia femoral. O HV foi extraído através da córnea e do cristalino, depois de esvaziar a câmara anterior do olho para evitar a contaminação da amostra. As amostras foram coletadas a cada 10 min, começando 10 minutos após a injeção de álcool. A última série de amostras foi coletada 120 minutos após a injeção. As análises das concentrações de etanol foram realizadas com um sistema de cromatografia gasosa acoplada a um detector por ionização em chama (CG-FID), descrita no artigo (FERNANDEZ *et al.*, 1989). Os resultados demonstraram que a meia-vida de eliminação do etanol no sangue e humor vítreo são semelhantes (32 min e 33 min, respectivamente) e os autores afirmam que o rápido transporte de etanol do plasma para o fluido ocular é provavelmente devido ao seu baixo peso molecular e à sua afinidade química para componentes específicos desse fluido (alta solubilidade em água do álcool). Os níveis de etanol no HV excederam as do sangue após 30 minutos. Após 80 minutos as concentrações de etanol entre as duas matrizes demonstraram um certo paralelismo, com os coeficientes de variação não superando os 5%. Dos 18 coelhos testados, a razão média entre as concentrações de etanol sangue/HV foram de $0,9 \pm 0,38$. Em 35 autópsias humanas realizadas pelos cientistas

em outro trabalho, a razão média das concentrações de etanol entre o sangue/HV foi de $0,91 \pm 0,14$, portanto as razões médias em coelhos e cadáveres humanos são comparáveis. Dessa forma, seria possível extrapolar as concentrações de etanol encontrados no HV para o sangue, mesmo em casos em que a coleta de sangue for impossível ou comprometida.

<i>Time (min)</i>	<i>B./V.H.</i>
10	3.71
20	1.21
30	0.97
40	0.77
50	0.71
60	0.60
70	0.54
80	0.44
90	0.41
100	0.44
110	0.41
120	0.42
Average ratios	
(80 to 120 min)	0.42
C.V. (80 to 120 min)^a	3.76%

^aC.V., coefficient of variation (average of 15 determinations).

Tabela 1 – Relações entre os níveis de etanol (g/L) em sangue (B.) e humor vítreo (V.H.). Em cada tempo, 3 amostras foram estudadas. (FERNÁNDEZ et al., 1989)

De Letter *et al.* (2000) questionaram se as concentrações de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) no HV pós-morte podem ser úteis como preditores para a carga de MDMA sanguíneo no momento da morte, já que a instabilidade e a redistribuição de drogas são fatores que afetam a interpretação dos níveis sanguíneos pós-morte. Utilizando um modelo animal (coelhos), foram realizados experimentos comparando a farmacocinética do MDMA no sangue e no HV *in vivo*. Em seguida foram realizados experimentos pós-morte, em que a estabilidade pós-morte de MDMA em HV foi comparada com o sangue em relação à certas temperaturas. 18 coelhos, sob anestesia local, tiveram um cateter implantado na principal artéria central da orelha direita, por onde foram coletadas amostras de

sangue arterial em determinados intervalos de tempo após a uma administração por infusão lenta de 1 mg/kg de MDMA pela orelha esquerda. As amostras de sangue foram separadas em plasma e sangue total e foram congeladas a -30°C até a análise. Ambos os olhos foram imediatamente congelados após a enucleação por imersão em nitrogênio líquido durante 1-2 minutos. Os olhos foram preservados a -30°C até os HV serem dissecados conforme descrito por Abel e Boyle (1976). As concentrações de MDMA e MDA (3,4-metilenodioxianfetamina) foram determinadas usando um procedimento de CLAE totalmente validado com detecção por fluorescência e toda a metodologia utilizada para extração e análise das amostras está descrito no artigo (DE LETTER *et al.*, 2000). As concentrações de MDMA foram medidas no HV 30, 120 e 240 min após a administração. As concentrações de MDA no plasma, no sangue e no HV foram baixas demais para a análise. As concentrações médias do plasma, do sangue e do HV de um olho 120 minutos após a infusão de MDMA (pouco tempo antes da morte dos animais) foram de 32 ± 17 , 42 ± 16 e 27 ± 7 ng/mL, respectivamente. As concentrações de MDMA no sangue estavam claramente aumentadas após a morte em comparação com os valores obtidos ante-morte, enquanto que as concentrações de MDMA_{vítreo} não se alteraram substancialmente após a morte. Os pesquisadores relatam que equilíbrio entre o plasma e o HV foi obtido entre 30 e 120 minutos, uma vez que as razões de MDMA_{vítreo}/MDMA_{plasma} não diferiram significativamente entre 120 e 240 minutos após a administração. As razões de MDMA_{vítreo} para MDMA_{sangue} nos tempos de 120 e 240 minutos ($1,1 \pm 0,3$ e $1,1 \pm 0,4$, respectivamente) indicam uma ligeira acumulação de MDMA no compartimento vítreo. Na segunda parte do estudo, quatro condições diferentes, 2°C ou 17°C e 25 ou 73 horas pós-morte, foram testadas. Os autores demonstraram que as concentrações de MDMA no sangue cardíaco aumentaram pós-morte, enquanto que os níveis de MDMA_{vítreo} foram muito mais estáveis e, portanto, mais representativos dos níveis sanguíneos ante-morte. Observaram-se diferenças relativamente pequenas entre os valores vítreos ante e pós-morte obtidos nas temperaturas de 2°C ou 17°C . A elevação da concentração de MDMA_{vítreo} 73 horas após a morte em coelhos preservados a 17°C pode ser parcialmente explicada pela desidratação que ocorreu e, teoricamente, um baixo nível de redistribuição pós-morte. Por outro lado, a concentração de MDMA aumentaram nas amostras de sangue cardíaco de coelho, tomadas 73 horas pós-morte, apontando para uma redistribuição. Em suma, De Letter *et al.* afirmam que após a administração intravenosa, MDMA pode ser facilmente identificada no HV dos

coelhos e um equilíbrio entre o HV e o compartimento vascular foi estabelecido após cerca de 1 hora. Além disso, os resultados confirmam que amostras de sangue cardíaco não devem ser usadas para análise toxicológica pós-morte dessa droga. De fato, o MDMA_{vítreo} do coelho foi mais estável do que os níveis cardíacos pós-morte. A amostragem vítrea para a determinação de MDMA parece ser uma boa prática de autópsia se há falta de sangue (por exemplo, como resultado de perda de sangue severa ou putrefação). Além disso, após o equilíbrio, o HV pode ser uma amostra de controle adequada em casos de valores sanguíneos erráticos devido ao viés do local de amostragem ou erros analíticos. Na verdade, níveis de MDMA no HV podem ser mais representativos do que as concentrações de MDMA no sangue quando há um intervalo pós-morte prolongado.

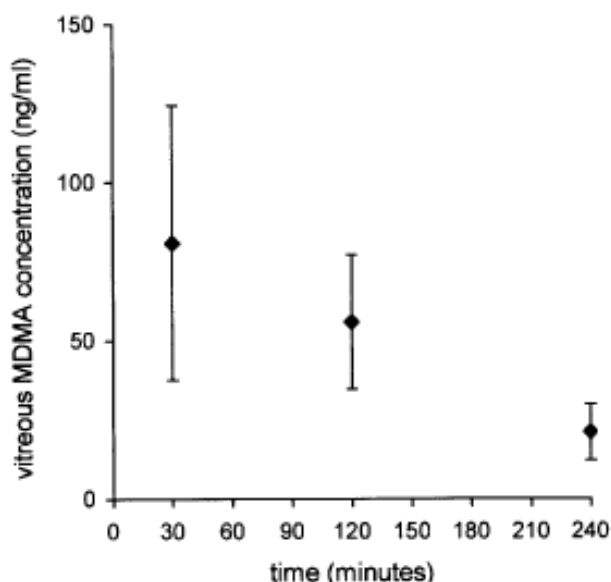


Figura 3 - Concentrações médias de MDMA em humor vítreo, em função do tempo em coelhos após uma dose intravenosa de 1 mg/kg de MDMA (n = 6 para cada tempo). Os resultados são expressos como médias \pm desvio padrão. (DE LETTER *et al.*, 2000)

4.2 Coleta, armazenamento e preparo das amostras de HV

O processo de coleta do HV é bem simples e os materiais necessários são de fácil acesso e provavelmente já estão disponíveis em qualquer laboratório forense. O HV pode ser adquirido inserindo uma agulha de calibre 18 ou 20 anexada a uma seringa de 10 mL no globo do olho. A inserção é melhor no canto lateral, logo acima da junção entre as pálpebras superior e inferior. Introduz-se o fim da agulha no centro

do globo, aproximadamente 2 cm, e o HV é gradualmente e lentamente retirado. Tubos de vácuo não devem ser usados porque a retina pode ser danificada, tornando a amostra inadequada. Aproximadamente 2 a 5 mL de fluido podem ser aspirados de cada olho e é recomendado que o HV de ambos os olhos seja coletado (já que ainda não sabemos se existem diferenças quantitativas e/ou qualitativas entre os olhos); mesmo 1 mL pode ser adquirido de um recém-nascido. A amostra deve ser colocada em um tubo estéril. O espécime deve ser claro e incolor. Se pequenas manchas de retina preto-marrom estiverem na amostra, então a amostra é considerada inadequada (COLLINS *et al.*, 2016; LEVINE e JUFER, 2008). Como amostras de HV tendem a ser mais estáveis e menos suscetíveis a proliferação bacteriana, o uso ou não de conservantes tem sido objeto de estudo para alguns pesquisadores

Holmgren *et al.* (2004), por exemplo, avaliaram a estabilidade de 46 drogas no HV pós-morte armazenado por um período de um ano a -20°C e compararam os resultados com amostras de sangue femoral, nas mesmas condições. As drogas incluíram benzodiazepínicos, antidepressivos, analgésicos, hipnóticos, entre outros. Utilizando como preservativo o Fluoreto de Potássio (KF), os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que a adição de KF ao HV apenas afetou a concentração de duas substâncias, etanol e zopiclona, em que as concentrações diminuíram nas amostras sem conservante. Nas amostras de sangue femoral com adição de KF e armazenado a -20°C, houveram mudanças significativas nas concentrações de drogas em 7 amostras dentro do período analisado, enquanto que nas amostras de HV, sem adição de conservante e nas mesmas condições de temperatura, mudanças significativas foram percebidas em apenas 2 casos (HOLMGREN *et al.*, 2004). Além disso, os autores também descobriram que dentre as 46 drogas testadas, houve uma correlação significativa entre as concentrações encontradas no sangue e no HV em 23 delas, mais uma vez corroborando a ideia de que o HV poderia substituir o sangue em casos que esse não pode ser coletado. E para as outras 23 drogas em que não houve correlação entre as concentrações, os autores relatam que isso ocorre provavelmente devido a porcentagem alta de ligação a proteínas plasmáticas dessas substâncias, já que a BSR permite apenas a passagem da fração livre.

Quanto ao preparo das amostras, a análise de drogas em HV é semelhante à análise em outros fluídos pós-morte. A maioria dos métodos publicados que foram desenvolvidos para o sangue e urina tem sido empregado com sucesso em HV. A

única diferença de tratamento, que nem sempre é necessário, seria devido a viscosidade do HV. Isso pode apresentar um problema com a instrumentação da amostra. Como a viscosidade é em grande parte devido ao componente de ácido hialurônico, a hialuronidase é frequentemente usada como agente de liquefação antes de uma análise química ser realizada. Alternativamente, o aquecimento do HV a 100°C durante 5 minutos seguido de arrefecimento, apesar do risco de perda de certas substâncias, é um método simples para melhorar a precisão da medição (COLLINS *et al.*, 2016). Como o HV é composto de aproximadamente 99% água, alguns métodos de análise foram usados seguindo pouca ou nenhuma preparação da amostra. Por exemplo, Chronister *et al.* (2001) analisaram a presença de benzoilecgonina (BE), um dos principais metabólitos da cocaína, em HV através de um imunoensaio de doador de enzimas clonadas, denominado CEDIA, sem qualquer preparação das amostras. Felscher *et al.* (1997) utilizaram um imunoensaio de polarização por fluorescência (FPIA) para detectar fármacos e drogas de abuso em HV sem pré-tratamento. Logan e Stafford (1990) testaram o HV para cocaína e BE por CLAE diluindo o HV 1:1 com água e filtrando através de uma pré-coluna de 3 cm.

Quando uma fase de pré-tratamento é utilizada, utilizam-se técnicas comuns de extração, como extração líquido-líquido (ELL) ou extração em fase sólida (EFS), dependendo das características dos analitos. Existem diversos métodos diferentes de extração, assim como variações desses mais comuns, que já foram utilizados no HV, mas a ELL e a EFS são certamente os mais utilizados. A ELL baseia-se na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do analito investigado pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. O processo envolve a adição de um solvente extrator seguida de agitação mecânica para promover o máximo de contato entre as fases orgânica e aquosa. Posteriormente, a mistura é submetida à centrifugação para otimizar a separação entre as fases e então a fase de interesse é recolhida para análise (WU *et al.* 2008; MYASEIN *et al.* 2009). Já a EFS é baseada no princípio de separação à base de afinidade como cromatografia em fase líquida, consistindo na separação líquido-sólido. Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo um sólido sorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para retirar os analitos de interesse da fase (BERRUETA *et al.*, 1995; KRISHNAN *et al.*, 1994).

4.3 Metodologias analíticas utilizando HV

Existe uma série de trabalhos publicados que comparam a eficiência do HV na detecção de drogas com outras matrizes biológicas como sangue e urina, mas geralmente esses estudos utilizam uma metodologia analítica voltada ao uso dessas matrizes mais tradicionais, portanto não leva em conta as particularidades do HV. Ao mesmo tempo, também existem artigos que detalham metodologias analíticas voltadas especificamente a identificação de drogas no HV. Metushi *et al.* (2016), por exemplo, estudaram a aplicabilidade do HV e avaliaram se ele serviria como substituto (ou auxiliar) do sangue total para a triagem rotineira de drogas em 51 casos de autópsia. Amostras de HV e sangue periférico foram coletadas das 51 autópsias. O sangue foi armazenado com fluoreto de sódio a 4°C enquanto que o HV foi armazenado nessa temperatura sem conservantes. As técnicas de extração e sistema de detecção utilizados foram EFS e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), respectivamente, e os detalhes da metodologia se encontram no trabalho (METUSHI *et al.*, 2016). O número total de achados que os pesquisadores obtiveram em sangue total e em HV foi de 209 e 169, respectivamente. O número total de compostos diferentes identificados foi de 71 para o sangue total e 60 para o HV. No teste de comparação das concentrações encontradas nas duas matrizes, das drogas em que a quantificação foi possível, observou-se um aumento significativo apenas nas concentrações de trazodona e diazepam em sangue total quando comparado com o HV, enquanto que as outras substâncias apresentaram concentrações equivalentes. Os autores concluíram que o HV pode ser uma matriz alternativa para a triagem qualitativa de drogas pós-morte. A **Tabela 2** apresenta a lista comparativa das substâncias que foram encontradas nas 51 autópsias.

Composto	Nº de achados no sangue	Nº de achados no HV
7-Aminoclonazepam	2	0
Lidocaína	4	3
Acetaminofeno	2	2
Meprobamato	1	1
Alprazolam	6	5
Metadona	3	3

Amitriptilina	3	3
Metronidazol	1	1
Benzoilecgonina	2	2
Mirtazapina	5	5
Benzotropina	2	0
Mitragynine	1	1
Brompheniramine	1	1
Morfina	10	5
Bupropiona	1	1
Naproxeno	1	0
Metabolitos de bupropiona	1	1
n-Desmetiltramadol	1	1
Carisoprodol	1	1
Nordazepam	9	6
Chlordiazepóxido	3	3
Norfluoxetina	1	1
Clorpromazina	1	1
Norpromethazine	1	1
Clorfeniramina	2	2
Nortriptilina	5	4
Citalopram	6	6
Norvenlafaxine	2	1
Clorfeniramina	1	1
O-desmetiltramadol	2	2
Cocaetileno	2	2
Olanzapina	2	2
Codeína	3	3
Oxicodona	6	5
Cyclobenzaprine	2	1
Oxymorphone	3	3
Desmethylocitalopram	1	0
Paroxetina	1	0
Desmetilvenlafaxina	1	0

Fenitoína	2	0
Dextrometorfano	4	4
Promethazina	2	1
Diazepam	9	6
Propranolol	1	1
Dihidrocodeína	4	3
Quetiapina	3	3
Difenhidramina	11	11
Metabolitos da quetiapina	6	5
Metabolito da difenidramina	2	2
Quinina	1	0
Doxilamina	5	5
Sertralina	3	2
Fentanil	2	2
Tapentadol	1	1
Fluconazol	2	2
Topiramato	2	2
Fluoxetina	4	4
Tramadol	2	2
Gabapentina	7	7
Trazodona	12	11
Haloperidol	1	0
Trihexifenidil	1	0
Hidrocodona	6	5
Trimethoprim	1	1
Hidromorfona	1	1
Venlafaxine	3	3
Ibuprofeno	2	0
Zolpidem	2	1
Levamisole	2	2
Zopiclona	2	1

Tabela 2 - Frequência de ocorrência de drogas/metabólitos em 51 casos de autópsia.
(METUSHI et al., 2016)

Outro estudo relevante é o trabalho de Costa *et al.* (2014), em que os pesquisadores desenvolveram uma metodologia para a análise de 12 drogas de abuso e seus metabólitos (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), ketamina, cocaína, cocaetileno, lidocaína, morfina, 6-MAM e heroína) no HV utilizando eletroforese capilar (EC) com detecção por arranjo de diodos (DAD). Foram usadas 87 amostras de HV humano e todos os resultados foram confirmados por uma metodologia de rotina de cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem (CL-EM/EM) (MUELLER *et al.*, 2005). O preparo das amostras foi conduzido por ELL, descrito no artigo (COSTA *et al.*, 2014). O método proposto pelos autores foi validado nos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, acurácia e recuperação de acordo com protocolos comumente aceitos na análise forense. A seletividade foi estabelecida por inspeção de amostras de HV em branco com drogas de abuso adicionados. De acordo com os autores, os resultados obtidos indicaram que o método pode ser considerado seletivo. O estudo de linearidade foi realizado com amostras de HV em branco enriquecidas com padrões dos analitos variando de 5 a 500 ng/mL, com injeção em triplicata em cada nível de concentração. Os resultados do estudo de linearidade foram aceitáveis, com coeficiente de determinação $>0,98$ e pouco erro de regressão. Os LD e LQ foram avaliados analisando uma série de amostras em branco de HV fortificadas com quantidades decrescentes de todos os analitos, até que as relações sinal-ruído de 3 e 10 foram atingidas, respectivamente. Os LD e LQ atingidos foram menores que 5 ng/mL e 10 ng/mL, respectivamente. A precisão foi estabelecida através da análise de amostras de HV nas seguintes concentrações: 50, 100 e 500 ng/mL em três dias diferentes com seis repetições para cada concentração, e a acurácia foi estabelecida nesses mesmos níveis de concentração por comparação dos valores nominais com os valores obtidos na curva analítica. Desvios-padrão relativos melhor que 12% e acurácia entre 86 e 118% foram encontrados. Os testes de recuperação foram realizados através da adição, as amostras de HV, de 100 ng/mL de cada substância (seis repetições) seguido de extração pelo procedimento de ELL descrito no trabalho. Os resultados foram então comparados a amostras de HV em branco que foram submetidas a ELL, mas os padrões de drogas foram incorporados apenas durante a reconstituição do material seco (COSTA *et al.*, 2014). A **Tabela 3** compila os resultados quantitativos da CE-DAD das amostras examinadas que apresentaram pelo menos uma das

substâncias investigadas aqui, ou seja, 9,5% do número total de amostras analisadas (87). Como observado, a cocaína foi detectada em 7,1%, cocaetileno em 3,6%, lidocaína em 2,4% e ketamina em 1,2% do número total de amostras analisadas.

Nº da amostra	Ocorrência criminal	Resultados	
		CE-DAD	CL-EM/EM
1	N/A	COC	COC, BEC, EME
2	Acidente de carro	KET	KET
3	Acidente de carro	COC	COC, BEC, EME, CET
4	Homicídio	COC	COC, BEC, EME, CET
5	Homicídio	COC	COC, BEC, EME, CET, LID
6	Homicídio	COC	COC, BEC, EME
7	Homicídio	COC	COC, BEC, EME
8	Queda	LID	LID, tramadol, bupivacaína

Tabela 3 - Resultados obtidos na análise de drogas de abuso e produtos de biotransformação em HV pelo método CE-DAD proposto e métodos confirmados de CL-EM/EM. Legenda: COC: cocaína; CET: cocaetileno; BEC: benzoilecgonina; EME: éster metílico de ecgonina; KET: ketamina; LID: lidocaína. (COSTA *et al.*, 2014)

Fernandez *et al.* (2013), elaboraram um método para a determinação simultânea de morfina, 6-MAM, codeína, cocaína, BE, cocaetileno, metadona e 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP) em HV por CLAE-DAD após EFS. Os detalhes da otimização do método de extração, assim como as condições cromatográficas, estão presentes no artigo (FERNANDEZ *et al.*, 2013). Os experimentos foram validados para linearidade, LD e LQ, precisão (intra-dia e inter-dia) e recuperação. A linearidade foi examinada a partir de um gráfico de calibração para cada droga em HV. As curvas foram plotadas utilizando a área dos picos dos analitos como uma função da concentração do analito, usando três repetições por nível de concentração. O LD foi determinado em cinco amostras de HV em branco, a partir da menor concentração detectável com uma relação sinal/ruído de pelo menos 3. O LQ foi considerado a menor concentração nas curvas de calibração, desde que a resposta para o analito no LQ fosse de pelo menos dez vezes a resposta para o branco. O pico do analito deveria ser identificável e reproduzível com uma precisão de 20% e uma acurácia de $\pm 20\%$. A precisão do método analítico foi determinada pela

proximidade entre os valores obtidos para uma série de amostras da mesma solução mãe, analisadas nas mesmas condições, utilizando cinco repetições para cada nível de concentração (baixa, média e alta) no mesmo dia (precisão intra-dia) ou em dias diferentes (precisão inter-dia). A recuperação do método mede a eficiência do procedimento de extração. Foi calculado comparando a resposta analítica de cinco repetições em branco, contendo uma concentração conhecida do analito antes da extração, com a resposta analítica de outras cinco repetições após a execução do procedimento de extração. Os dados obtidos no estudo de linearidade foram usados para realizar análises de regressão e de variância e ambos demonstraram bons resultados, com coeficientes de correlação acima de 0.99 para todas as drogas estudadas. Os LD encontrados foram de: 29 ng/mL para morfina, 14 ng/mL para codeína, 25 ng/mL para 6-MAM, 12 ng/mL para cocaína, 10 ng/mL para BE, 28 ng/mL para cocaetileno, 24 ng/mL para EDDP e 28 ng/mL para metadona. O LQ ficou estabelecido em 100 ng/mL para todas as drogas. Foram analisadas cinco amostras de HV em branco para avaliar a seletividade do método. A ausência de resposta analítica nos tempos de retenção das substâncias-alvo demonstrou que não houve interferência. As precisões intra e inter-dia foram examinadas em três diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto) de drogas de abuso em HV. Ambos os estudos deram bons resultados com coeficientes de variação inferiores a 12,5%. A recuperação foi estudada nos mesmos três níveis de concentração usados no teste de precisão. Os valores obtidos são maiores para a alta concentração (4 µg/mL) de morfina e BE, a concentração média (1 µg/mL) de codeína, 6-MAM e cocaetileno e a baixa concentração (0,1 µg/mL) de cocaína, EDDP e metadona. As recuperações médias variaram de 66,4% para EDDP para 97,1% para 6-MAM. A eficiência do procedimento de extração para BE foi comparável à relatada por Fernández *et al.* (2006) e maior para BE e cocaína em comparação com outros estudos (Logan e Stafford, 1990; Fernández *et al.*, 1994). Finalmente, este método foi aplicado à quantificação de drogas de abuso em 15 amostras de HV de usuários de opiáceos e/ou cocaína, após a aplicação de um ensaio imunoenzimático e CG-EM em urina para demonstrar a presença dessas substâncias (**Figura 4**). Os autores concluem que os resultados obtidos demonstram a aptidão do HV como uma matriz biológica alternativa para a determinação de drogas de abuso (FERNANDEZ *et al.*, 2013).

Case	Drug	Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	Benzoylecgonine	6.84
	Cocaine	1.95
2	Benzoylecgonine	0.13
3	Benzoylecgonine	3.84
4	Morphine	0.15
	6-Acetylmorphine	0.24
	Benzoylecgonine	1.98
	Cocaine	0.10
5	Benzoylecgonine	0.96
6	Benzoylecgonine	0.12
	Methadone	0.12
7	Benzoylecgonine	0.63
	Methadone	0.10
8	Benzoylecgonine	0.51
	Cocaethylene	0.15
	EDDP	0.69
9	Benzoylecgonine	0.66
	Codeine	0.10
10	Morphine	0.45
	Cocaine	0.37
11	EDDP	0.66
12	Benzoylecgonine	0.10
13	Benzoylecgonine	0.11
	Methadone	0.21
14	Benzoylecgonine	0.24
15	Benzoylecgonine	0.15

Figura 4 – Concentrações em amostras de HV retirados de autópsias reais. (FERNANDEZ *et al.*, 2013)

Arora *et al.* (2016) desenvolveram e validaram um método para a identificação e quantificação simultânea de 24 analitos de relevância forense em HV utilizando uma técnica de ionização por eletro pulverização com cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem (ES-CL-EM/EM). As substâncias analisadas incluem benzodiazepínicos, analgésicos, opiáceos, estimulantes, anti-histamínicos, antipsicóticos, anticolinérgicos, β -bloqueadores, hipnóticos, bloqueadores de canais cálcio e vasodilatadores. De acordo com os autores, esse método é vantajoso em relação aos métodos existentes em dois aspectos principais: primeiro, o protocolo de preparação de amostra foi simplificado; segundo, a quantidade de amostra necessária para análise foi diminuída. Ambos os aspectos são cruciais no cenário forense, onde a falta de volume de amostra pode limitar o número de testes a serem conduzidos.

Nesse estudo, um pequeno volume de 20 μ L foi o suficiente. A forma de extração utilizada foi a ELL e a lista de solventes, assim como os detalhes da instrumentação e o passo a passo da preparação das amostras de controle de qualidade e padrões estão presentes no trabalho (ARORA *et al.*, 2016). O método proposto pelos pesquisadores foi totalmente validado para seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, acurácia, recuperação e efeito matricial de acordo com as diretrizes de validação de métodos bioanálíticos da *Food and Drug Administration* (FDA). A separação dos 24 analitos, assim como dos padrões internos de homatropina e sulfadimetoxina foi alcançada em 20 minutos. No teste de seletividade, interferência da matriz não foi detectada em nenhum dos tempos de retenção dos analitos ou nos padrões internos em seis lotes diferentes do HV em branco. Os coeficientes de regressão das curvas de calibração foram superiores a 0,99 para todas as drogas no HV em todas as ocasiões. O LD para o HV foi de 0,98 ng/mL (para 15 analitos) a 3,9 ng/mL (clonazepam e clonidina), enquanto que o LQ foi de 7,8 ng/mL para todos os analitos, exceto para acetaminofeno, nicotina, petidina e feniramina para o qual foram 11,7; 7,9; 9,7 e 8,8 ng/mL, respectivamente. Quanto a precisão e acurácia, todos os resultados estavam dentro dos limites dos critérios do FDA. A acurácia e a precisão intra-dia do método em HV variou de 85,8% (zolpidem) a 119% (olanzapina) e 1,4% (morfina) a 18,9% (cocaína), respectivamente. A acurácia e a precisão inter-dias variou de 87,0% (amlodipina) a 120% (olanzapina) e 1,5% (amlodipina) a 20,0% (flunitrazepam), respectivamente. A recuperação absoluta de todos os 24 analitos em HV variou de 71,2 a 119% com uma média de 84,5% e o efeito matricial foi encontrado entre 78,5 e 120% com uma média de 105%. O efeito de transição (um efeito que "transporta" de uma condição experimental para outra) no HV foi inferior a 1% para a olanzapina, diazepam e heroína e para outras drogas foi zero. Terminado os experimentos de validação, os autores aplicaram sua metodologia para a triagem das 24 substâncias em 40 amostras de cadáveres humanos e os resultados dessas análises estão presentes na **Figura 5**. Na maioria dos casos, foram detectadas várias drogas usando o método desenvolvido. As substâncias eram um dos metabolitos principais da droga ou estavam presentes em combinação com um medicamento terapêutico. Os pesquisadores comentam que o método foi adequado até para a detecção e quantificação de medicamentos polares, algo que em outros trabalhos (como o de PALENDER *et al.*, 2010) não foi possível, devido a BSR. Além disso, a concentração detectada de drogas na maioria dos casos foi promissora.

Case No.	Age/Gender	Analytes detected	Vitreous Conc. (ng/ml)
1	30/M	Acetaminophen	92.1
		Amlodipine	8.8
		Atropine	8.4
		Nicotine	8.1
2	16/M	Atropine	95.7
		Diazepam	16.8
		Nordiazepam	8.1
3	45/F	Atropine	28.9
4	40/M	Acetaminophen	69.1
		Atropine	13.5
		Olanzapine	66.0
		Pheniramine	220
5	50/M	Nicotine	57.2
6	20/F	Alprazolam	8.0
7	30/F	Acetaminophen	2265
		Atropine	203
		Pheniramine	313
8	19/M	Atropine	14.2
		Diazepam	11.6
		Nicotine	9.0
		Nordiazepam	ND
		Pheniramine	109
9	42/M	Nicotine	161
		Olanzapine	42.3
10	29/M	Alprazolam	18.0
		Nicotine	208

Figura 5 - Achados positivos de várias drogas no HV em dez casos de autópsia após triagem por CL-EM/EM. ND = não detectado. (ARORA *et al.* 2016)

Existem uma série de trabalhos publicados que demonstram a utilidade de se usar o HV nas análises de toxicologia forense. A seguir, apresento 17 desses trabalhos resumidos na **Tabela 4**.

Objetivo	Analitos	Método de extração	Método de análise	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Referência
Validar um método para identificação de drogas de abuso em HV utilizando extração assistida por microondas	COC, BE, CE, morfina, codeína, 6-MAM, metadona e EDDP	Extração assistida por microondas (Diclorometano) e EFS (cartuchos Oasis HLB)	CLAE-DAD	33-76 ng/mL	100 ng/mL	Fernandez et al., 2011
Estudo de caso de uma ingestão fatal de Metanfetamina	Metanfetamina e anfetamina	ELL (cloreto de n-butilo/cloreto de metileno 4:1)	CG-EM	-	-	Kiely <i>et al.</i> , 2009
Investigar álcool isopropílico como biomarcador em HV, sangue e urina em investigações forenses	Acetona e álcool isopropílico	-	Head Space-CG-FID	-	-	Palmiere <i>et al.</i> , 2012
Estudar a distribuição pós-morte de cocaína em 3 estruturas cerebrais e compara com HV e sangue	COC e BE	EFS (cartuchos Varian)	CLAE-DAD	-	-	Carvalho <i>et al.</i> , 2013
Comparar concentrações de álcool encontrados no HV e sangue	Etanol, metanol, isopropanol e acetona	-	Head Space-CG-FID	-	0.005 g/100 mL	Honey <i>et al.</i> , 2005
Validar um método para determinação de “novas substâncias psicoativas” em HV, fluido pericárdico e sangue	d-C, EF, MC, PMA, MF, MT, DOM, DOB, 2C-H, 2C-B, 2C-I, 2C-T-2, 2C-T-4 e 2C-T-7	EFS (cartuchos Oasis MCX)	CG-EM	5 ng/mL	5 ng/mL	Margalho <i>et al.</i> , 2016

Determinação de opiáceos em HV e sangue com o intuito de otimizar a hidrólise enzimática dos glucuronídeos	Morfina, codeína, 6-MAM, M-3-G e M-6-G	EFS (cartuchos com certificado <i>Bond Elut</i> da Varian)	CG-EM	2 ng/mL	10 ng/mL	Sanches <i>et al.</i> , 2012
Desenvolvimento de um método para identificação de anticonvulsivantes em HV usando CLAE	PD, PhB, BB, Fenitoína, HB, AB, Carb, SB, MB, CP	-	CLAE-DAD	0,05 µg/ml	-	Logan <i>et al.</i> , 1989
Estudar a distribuição de opiáceos no HV e sangue	Morfina, codeína, 6-MAM e M-3-G	EFS (cartuchos <i>mixed mode</i> Biotage)	CG-EM/EM	-	-	Rees <i>et al.</i> , 2013
Examinar a possibilidade de usar o HV para identificar etil glucuronídeo (EtG) como biomarcador de uso de álcool	Etanol e EtG	ELL (acetonitrila/metanol)	Head space-CG-FID e CLAE/ES-EM/EM	0,005 mg/mL	0,01 mg/mL	Vezzoli <i>et al.</i> , 2015
Estudar o uso de EtG e etil sulfato (EtS) como marcadores de uso de álcool em HV	EtG, EtS e etanol	ELL (metanol)	CLAE-EM/EM	0,05 mg/mL	0,1 mg/ml EtG e etanol; 0,13 mg/ml EtS	Thierauf <i>et al.</i> , 2011
Utilização de um imunoensaio para detectar EtG em HV	EtG	-	Ensaio imunoenzimático (Architect c8000)	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL	Rainio <i>et al.</i> , 2013
Investigar os níveis de EtG em HV e comparar com os níveis em sangue e urina	EtG	ELL (metanol)	CLAE-ES-EM	0,03 mg/mL	0,09 mg/mL	Keten <i>et al.</i> , 2009

Desenvolver um método para a determinação de quatro benzodiazepínicos em HV usando ELL e CLAE	flurazepam, lorazepam, alprazolam e diazepam	ELL (n-hexano/acetato de etila 70:30)	CLAE-DAD	30 ng/mL	100 ng/mL.	Bazmi <i>et al.</i> , 2016
Estudar a estabilidade do GHB endógeno em HV vs sangue em cadáveres	Ácido Gamma-hidroxibutírico (GHB)	ELL (etil acetato)	CG-EM	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	Busardò <i>et al.</i> , 2017
Estudo de caso: análise de GHB em HV transformou violência sexual em morte natural devido a síndrome	GHB	ELL (etil acetato)	CG-EM	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	Busardò <i>et al.</i> , 2017
Caracterizar mudanças pós-morte nas concentrações de COC e metabólitos em relação às concentrações ante-morte no sangue e HV	COC, BE, EME	ELL (clorofórmio/isopropanol)	CG-EM	-	-	McKinney <i>et al.</i> , 1995
Determinar a correlação entre níveis de Diazepam em HV e sangue (coelhos)	Diazepam (DZ) e desmetildiazepam (DMD)	EFS (cartuchos Oasis HLB)	CLAE-DAD e CLAE-EM	0.242 pg/mL DZ; 0.378 pg/mL DMD	0.807 pg/mL DZ; 0.126 pg/mL DMD	Teixeira <i>et al.</i> , 2004

Tabela 4 – Coletânea de trabalhos científicos envolvendo o uso de HV para a identificação de xenobióticos de relevância forense.

Obs: Para os trabalhos que utilizaram mais de uma matriz biológica, os valores de LD e LQ apresentados são os relacionados ao HV.

Legenda: COC – cocaína; BE – benzoilecgonina; EME – éster metílico de ecgonina; CE – cocaetileno; d-C – d-catina; EF – efedrina; MC – metacina; PMA - 1- (4-metoxifenil) propan-2-amina; MF – mefedrona; MT – metedrona; DOM - 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina; DOB - 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina; 2C-H - 2,5-dimetoxifenetilamina; 2C-B - 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; 2C-I - 4-iodo-2,5-dimetoxifenetilamina; 2C-T-2 - 2-[2,5-dimetoxi-4- (etiltio) fenil] etanamina; 2C-T-4 - 2,5-dimetoxi-4-isopropiltiofenetilamina; 2C-T-7 - 2-[2,5-dimetoxi -4-(propiltio) fenil] etanamina; 6-MAM – 6-monoacetilmorfina; M-6-G – morfina-6-glucuronídeo; M-3-G – morfina-3-glucuronídeo; EDDP - 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina; PD – primidona; PhB – fenobarbital; BB – butabital; HB – hexobarbital; AB – amobarbital; Carb – carbamazepina; SB – secobarbital; MB – meprobamato; CP – carisprodol.

5 DISCUSSÃO

Através da avaliação dos diversos trabalhos publicados em relação ao tema, está claro que existem uma série de vantagens a favor do HV para a análise de drogas. As amostras podem ser facilmente obtidas durante o exame pós-morte, mesmo se uma autópsia completa não foi realizada. A matriz biológica é extremamente simples, consistindo essencialmente de água. Portanto, do ponto de vista analítico, é um espécime muito fácil de se trabalhar. E de acordo com a literatura, as metodologias analíticas desenvolvidas para as matrizes mais tradicionais, como urina ou sangue, são facilmente aplicáveis às análises com HV. Para procedimentos cromatográficos por exemplo, que representam a grande maioria das metodologias aplicadas em laboratórios forenses do mundo todo, o uso do HV faz com que seja necessário menos preparação das amostras. É importante destacar que, também devido à baixa complexidade da matriz, amostras de HV podem ser armazenadas por períodos mais longos e com menos necessidade do uso de conservantes, sem que ocorra perda significativa de analitos.

Devido à localização anatômica privilegiada do HV, isolada do resto do corpo humano, essa matriz está mais protegida contra a putrefação, a carbonização e o trauma comparado a fluidos e tecidos mais centralizados. Durante o processo de putrefação de cadáveres, alguns produtos de decomposição podem interferir com a extração e análise de muitas drogas em amostras de sangue. Esse fator é menos relevante com a análise de drogas em HV. Além disso, quando uma morte envolve trauma aos órgãos centrais, muitas vezes o único espécime que está disponível é o sangue da cavidade abdominal/torácica, o que aumenta o potencial de contaminação por tecidos e conteúdo estomacal. Nestes casos, o HV se destaca como uma matriz alternativa útil.

Contudo, há também algumas desvantagens na utilização do HV para análise de drogas. Uma das principais desvantagens é o pequeno volume de amostra disponível. Geralmente, na melhor das hipóteses, apenas cerca de 5 mL de HV podem ser coletados em cada caso. Portanto se forem necessárias múltiplas análises, pode ser necessário usar um volume menor de amostra para cada ensaio, limitando a sensibilidade desse. Alguns ensaios podem nem mesmo ser possíveis de realizar, devido ao volume de amostra limitado. Outra desvantagem quanto ao uso do HV para a análise de drogas é um banco de dados limitado do qual as avaliações

interpretativas dos resultados analíticos podem ser feitas. E apesar da grande maioria das substâncias que podem ser identificadas no sangue e urina também poderem ser encontrados no HV, a existência da BSR faz com que certas substâncias sejam mais difíceis de serem detectadas nessa matriz biológica. Por esses motivos, atualmente, a utilidade do HV na análise de drogas é mais como um complemento da análise de drogas no sangue e urina, ao invés de um substituto. É importante ressaltar também que, em laboratórios que realizam a retirada da córnea para doação, a coleta de HV pode inviabilizar esse procedimento.

É importante ressaltar também que as limitações do uso de HV para os fins da toxicologia forense dizem respeito, em grande parte, à interpretação quantitativa. Apesar de existirem estudos que dizem o contrário, certos trabalhos que foram conduzidos que focaram na interpretação de apenas as concentrações de xenobióticos no HV mostram que as concentrações no HV e no sangue não se correlacionam para todos os compostos. Em outras pesquisas, dependendo da substância sendo analisada, a dispersão dos dados impede a extrapolação para concentrações sanguíneas sem erro significativo. Geralmente esta dispersão é reflexo de vários parâmetros não controláveis e muitas vezes desconhecidos, como o tempo de sobrevivência, o intervalo pós-morte, patologias oftálmicas e a interação de drogas. Para otimizar a interpretação quantitativa, várias estratégias devem ser tomadas, sendo uma das mais importantes a melhora do nosso conhecimento quanto a distribuição de xenobióticos de interesse forense em HV.

6 CONCLUSÃO

Uma matriz biológica alternativa ideal para o uso nas análises da toxicologia forense deve permitir a detecção dos mesmos xenobióticos encontrados no sangue, em concentrações correlacionadas e sofrer menos influência dos efeitos pós-morte. O HV, com o conhecimento que temos hoje, parece ser a matriz que provavelmente se aproxima desse ideal. No que diz respeito as análises qualitativas, quando a coleta de sangue não é possível ou é modificado por fatores pós-morte, o HV aparenta ser extremamente útil. Além disso, ele é fácil de ser amostrado, os compostos que se acumulam dentro dele tendem a ser mais estáveis (se certas condições de armazenamento forem garantidas) e as análises com o HV costumam ser mais diretas, sem a necessidade de muita preparação anterior ou com preparo simplificado. E para certos compostos (como 6-MAM ou cocaína), a janela de detecção é maior do que a presente no sangue. Para melhorar ainda mais as qualidades dessa matriz, seria interessante reforçar as técnicas dedicadas a utilização de HV para que alcancem limiares de detecção ainda mais baixos do que os vistos na maioria das outras matrizes forenses complexas. Além disso, melhorar a nossa compreensão de como ocorre o transporte de drogas através da BSR permitiria esclarecer as maneiras em que o HV poderia ser aproveitado em ensaios estritamente quantitativos.

REFERÊNCIAS

- ARORA, B. VELPANDIAN, T. SAXENA, R. LALWANI, S. DOGRAC, T. D. GHOSEA, S. Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humour, whole blood and plasma. **Drug Test. Analysis**, volume 8, p. 86-97, 2016.
- BANIAK, N. CAMPOS-BANIAK, G. MULLA, A. KALRA, J. Vitreous Humor: A Short Review on Post-mortem Applications. **J. Clin. Exp. Pathol.**, volume 4, edição 6, 2015.
- BAZMI, ELHAM. BEHNOUSH, BEHNAM. AKHGARI, MARYAM. BAHMANABADI, LEILA. **SAGE Open Medicine**, volume 4, p. 1–7, 2016.
- BÉVALOT, F. CARTISER, N. BOTTINELLI, C. FANTON, L. GUITTON, J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. **Forensic Toxicol.**, volume 34, p.12-40, 2016.
- BORDIN, D. MONEDEIRO, F. CAMPOS, E. ALVES, M. BUENO, L. MARTINIS, B. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatogr.**, volume 7, número 2, p. 125-143, 2015.
- BUSARDÒ, FRANCESCO PAOLO. MANNOCCHI, GIULIO. GIORGETTI, RAFFAELE. PELLEGRINI, MANUELA. BAGLIO, GIOVANNI. ZAAMI, SIMONA. MARINELLI, ENRICO. PICHINIC, SIMONA. Stability of endogenous GHB in vitreous humor vs peripheral blood in dead bodies. **Forensic Sci. Int.**, volume 274, p. 64–69, 2017.
- BUSARDÒ, FRANCESCO PAOLO. PORTELLI, FRANCESCA. MONTANA, ANGELO. ROTOLO, MARIA CONCETTA. PICHINIC, SIMONA. MARESI, EMILIANO. When a death apparently associated to sexual assault is instead a natural death due to idiopathic hypereosinophilic syndrome: the importance of gamma-hydroxybutyric acid analysis in vitreous humor. **Legal Medicine**, volume 26, p. 92–97, 2017.

CARVALHO, VIRGINIA M. FUKUSHIMA, ANDRÉ R. FONTES, LUIZ R. FUZINATO, DANIELA V. FLORIO, JORGE C. CHASIN, ALICE A. M. Cocaine postmortem distribution in three brain structures: A comparison with whole blood and vitreous humour. **J. of Forensic and Legal Medicine**, volume 20, p. 143-145, 2013.

CHRONISTER, CHRIS W. WALRATH, JESSICA C. GOLDBERGER, BRUCE A. Rapid Detection of Benzoylecgonine in Vitreous Humor by Enzyme Immunoassay. **J. of Anal. Toxicol.**, volume 25, p. 621-624, 2001.

COLLINS, KIM A. **Postmortem Vitreous Analyses**, 2016. Disponível em: <https://emedicine.medscape.com/article/1966150-overview>. Acessado em: 10/05/17

COSTA, J. MORRONEB, A. RESENDEC, R. CHASIND, A. TAVARES, M. Development of a method for the analysis of drugs of abuse in vitreous humor by capillary electrophoresis with diode array detection (CE–DAD). **J. Chromatogr. B**, 945-946, p. 84-91, 2014.

DE LETTER, E. A. PAEPE, P. DE. CLAUWAERT, K. M. BELPAIRE, F. M. LAMBERT, W. E. VAN BOCXLAER, J. F. PIETTE, M. H. A. Is vitreous humour useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood levels? Experimental approach with rabbits. **Int. J. Legal Med.**, volume 114, p. 29–35, 2000.

FELSCHER, D. GASTMEIER, G. DRESSLER, J. Screening of Pharmaceuticals and Drugs in Synovial Fluid of the Knee Joint and in Vitreous Humor by Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA). **J. of Forensic Sci.**, volume 43, nº 3, p. 619–621, 1998.

FERNANDEZ, P. LOPEZ-RIVADULLA, M. LIRARES, J.M. TAT0, F. BERMEJO, A.M. A COMPARATIVE PHARMACOKINETIC STUDY OF ETHANOL IN THE BLOOD, VITREOUS HUMOUR AND AQUEOUS HUMOUR OF RABBITS. **Forensic Sci. Int.**, volume 41, p. 161- 65, 1989.

FERNANDÉZ, P. SEOANE, S. VÁZQUEZ, C. BERMEJO, A. CARRO, A. LORENZO, R. A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the

determination of drugs of abuse in vitreous humor. **Anal. Bioanal. Chem.**, volume 401, p. 2177–2186, 2011.

FERNANDÉZ, P. SEOANE, S. VÁZQUEZ, C. TABERNERO, M. CARROB, A. LORENZO, R. Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction. **J. App. Toxicol.**, volume 33, p. 740-745, 2013.

GALLARDO, E. QUEIROZ, J. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **Biomed. Chromat.**, volume 8, p. 795-821, 2008.

GAUDANA, RIPAL. ANANTHULA, HARI KRISHNA. PARENKY, ASHWIN. MITRA, ASHIM K. Ocular Drug Delivery. **The AAPS Journal**, volume 12, nº 3, p. 348-360, 2010.

GOTTAS, ANDRÉ. ARNESTAD, MARIANNE. HALVORSEN, PER STEINAR. BACHS, LILIANA C. HØISETH, GUDRUN. Pharmacokinetics of heroin and its metabolites in vitreous humor and blood in a living pig model. **Forensic Toxicol.**, volume 34, p. 277–285, 2016.

HOLMGREN, PER. DRUID, HENRIK. HOLMGREN, ANITA. AHLNER, JOHAN. Stability of Drugs in Stored Postmortem Femoral Blood and Vitreous Humor. **J. of Forensic Sci.**, volume 49, nº 4, p. 1-6, 2004.

HONEY, DONNA. CAYLOR, CURTIS. LUTHI, RUTH. KERRIGAN, SARAH. Comparative Alcohol Concentrations in Blood and Vitreous Fluid With Illustrative Case Studies. **J. of Anal. Toxicol.**, volume 29, p. 365-369, 2005.

KETEN, ALPER. TUMER, ALI RIZA. BALSEVEN-ODABASI, AYSUN. Measurement of ethyl glucuronide in vitreous humor with liquid chromatography–mass spectrometry. **Forensic Sci. Int.**, volume 193, p. 101–105, 2009.

KIELY, ELIZABETH. JEFF LEE, C. MARINETTI, LAUREEN. A Fatality from an Oral Ingestion of Methamphetamine. **J. of Anal. Toxicol.**, volume 33, p. 557-560, 2009.

LEVINE, B. Forensic toxicology. **Analytical Chemistry**, volume 65, nº 5, p. 272-276, 1993.

LEVINE, B. JUFER, R. Drug Testing in Alternate Biological Specimens, **Humana Press**, 2008.

LOGAN, B.K. STAFFORD, D.T. DIRECT ANALYSIS OF ANTICONVULSANT DRUGS IN VITREOUS HUMOUR BY HPLC USING A COLUMN SWITCHING TECHNIQUE. **Forensic Sci. Int.**, volume 41, p. 125- 134, 1989.

LOGAN, B.K. STAFFORD, D.T. High-Performance Liquid Chromatography with Column Switching for the Determination of Cocaine and Benzoyllecgonine Concentrations in Vitreous Humor. **J. of Forensic Sci.**, volume 35, nº 6, p. 1303-1309, 1990.

MARGALHO. CLÁUDIA. CASTANHEIRA, ALICE. REALA, FRANCISCO CORTE. GALLARDO, EUGENIA. RIVADULLA, MANUEL LÓPEZ. Determination of “new psychoactive substances” in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. **J. of Chromatogr. B**, volume 1020, p. 14–23, 2016.

MCKINNEY, P. E. PHILLIPS, S. GOMEZ, H. E. BRENT, J. MACLYNTRE, M. WATSON, W. A. Vitreous Humor Cocaine and Metabolite Concentrations: Do Postmortem Specimens Reflect Blood Levels at the Time of Death?. **J. of Forensic Sci.**, volume 40, nº 1, p. 102-107, 1995.

METUSHI, IMIR G. FITZGERALD, ROBERT L. MACLYNTRE, IAIN M. Assessment and Comparison of Vitreous Humor as an Alternative Matrix for Forensic Toxicology Screening by GC–MS. **J. of Anal. Toxicol.**, volume 40, p. 243–247, 2016.

MUELLER, C. A. WEINMANN, W. DRESEN, S. SCHREIBER, A. GERGOV, M. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, volume 19, p. 1332–1338, 2005.

PALMIERE, CRISTIAN. SPORKERT, FRANK. WERNER, DOMINIQUE. BARDY, DANIEL. AUGSBERGER, MARC. MANGIN, PATRICE. Blood, urine and vitreous isopropyl alcohol as biochemical markers in forensic investigations. **Legal Medicine**, volume 14, p. 17–20, 2012.

PAWLISZYN, J. Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation. **Amsterdam: Elsevier**, p. 785-786, 2002.

RAINIO, JUHA. KULTTI, JOHANNA. KANGASTUPA, PÄIVIKKI. TUOMI, HEIDI. AHOLA, SANNA. KARHUNEN, PEKKA J. HELANDER, ANDERS. NIEMELÄ, ONNI. Immunoassay for ethyl glucuronide in vitreous humor: A new tool for postmortem diagnostics of alcohol use. **Forensic Sci. Int.**, volume 226, p. 261–265, 2013.

REES, KELLY A. POUNDER, DERRICK J. OSSELTON, M. DAVID. Distribution of opiates in femoral blood and vitreous humour in heroin/morphine-related deaths. **Forensic Sci Int.**, volume 226, p. 152–159, 2013.

SANCHES, LIVIA RENTAS. SEULIN, SASKIA CAROLINA. LEYTON, VILMA. PARANHOS, BEATRIZ APARECIDA PASSOS BISMARA. PASQUALUCCI, CARLOS AUGUSTO. MUÑOZ, DANIEL ROMERO. OSSELTON, MICHAEL DAVID. YONAMINE, MAURICIO. Determination of Opiates in Whole Blood and Vitreous Humor: A Study of the Matrix Effect and an Experimental Design to Optimize Conditions for the Enzymatic Hydrolysis of Glucuronides. **J. of Anal. Toxicol.**, volume 36, p. 162–170, 2012.

SKOPP, G. Pre-analytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Sci Int.**, volume 142, p. 75-100, 2004.

TEIXEIRA, H. M. REIS, F. PROEGNA, P. RAMOS, P. QUIFITELA, O. LOPEZ-RIVADULLA, M. MARQUES, E. VIEIRA, D. N. Vitreous humour as a complementary sample to blood for the detection/confirmation of diazepam: ante-mortem and post-mortem studies in an animal model. **H. & Exp. Toxicol.**, volume 23, p. 571- 577, 2004.

THEIRAUF, ANNETTE. KEMPF, JÜRGEN. PERDEKAMP, MARKUS GROßE. AUWÄRTER, VOLKER, GNANN. WOHLFARTH, HEIKE ARIANE. WEINMANN, WOLFGANG. Ethyl sulphate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior to death. **Forensic Sci. Int.**, volume 210, p. 63–68, 2011.

URTTI, ARTO. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, volume 58, p. 1131–1135, 2006.

VEZZOLI, SARA. BERNINI, MARZIA. FERRARI, FRANCESCO DE. Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol. **Ann Ist Super Sanità**, volume 51, nº 1, p. 19-27, 2015.

What is Forensic Toxicology?. **The Forensic Toxicology Council**, 2010. Disponível em: http://www.swgtox.org/documents/WHAT_IS_FORENSIC_TOXICOLOGY.pdf. Acessado em: 09/05/17.